



IPW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of ) Attorney Docket No.: **STURK0007**  
Hanns-Wolf BAENKLER et al. ) Confirmation No.: 7997  
Serial No.: 10/727,568 ) Group Art Unit: 1743  
Filed: December 5, 2003 ) Examiner: Unknown  
For: **DIAGNOSTIC METHOD BASED ON** ) Date: February 1, 2005  
**LIPID MEASURING PARAMETER**  
**MODULATIONS. . .**

**SUBMISSION OF CLAIM FOR PRIORITY AND PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filing Date</u>
PCT/EP 02/06167	PCT	June 5, 2002

Respectfully submitted,

*GRIFFIN & SZIPL, P.C.*

\_\_\_\_\_  
Joerg-Uwe Szipl  
Registration No. 91,799

GRIFFIN & SZIPL, P.C.  
Suite PH-1  
2300 Ninth Street, South  
Arlington, VA 22204

Telephone: (703) 979-5700  
Facsimile: (703) 979-7429  
Email: gands@szipl.com  
Customer No.: 24203

**BEST AVAILABLE COPY**  
**CERTIFIED COPY OF**  
**BEST AVAILABLE COPY**  
**PRIORITY DOCUMENT**



**Bescheinigung**

**Certificate**

**Attestation**

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

**17 DEC 2004**

**CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT**

Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.



**C. v.d. Aa-Jansen**

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

**PCT/EP 02/06167**



Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demande n°:

PCT/EP 02/06167

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):

1. BAENKLER, Hanns-Wolf - Herzogenaurach, Deutschland  
2. SCHÄFER, Dirk - Forchheim, Deutschland

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:

Diagnostisches Verfahren

Anmeldetag:  
Date of filing:  
Date de dépôt:

05. Juni 2002 (05.06.2002)

In Anspruch genommene Priorität(en)  
Priority(ies) claimed  
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat: Deutschland  
State:  
Pays:

Tag: 05. Juni 2001  
Date: (05.06.2001)

Aktenzeichen: 01113712.2  
File no.  
Numéro de dépôt:

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)  
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)  
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

## PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 04.06.2002 04:20:52 PM

IV-1	Anwalt oder gemeinsamer Vertreter; oder besondere Zustellanschrift Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt, um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten, und zwar als:	Anwalt
IV-1-1	Name (FAMILIENNAME, Vorname):	STÜRKEN, Joachim
IV-1-2	Anschrift:	J. Stürken Patentanwaltsgesellschaft mbH Engesserstr. 4a D-79108 Freiburg Deutschland
IV-1-3	Telefonnr.	0761/ 5563012
IV-1-4	Telefaxnr.	0761/ 5563014
IV-1-5	e-mail	info@patent-gmbh.de
V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM ZW

**Diagnostisches Verfahren**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sicherung oder zum  
Ausschluss von Risikokonstellationen, Krankheitszuständen der  
Prädispositionen dafür, sowie ein Verfahren zur Überwachung  
des Verlaufs von Therapien und zum Auffinden von Wirkstoffen  
zur Behandlung von Krankheitszuständen und zum Auffinden von  
Wirkstoffen, die einen solchen Krankheitszustand auslösen  
können, auf der Grundlage von Lipidmessparameter-Modula-  
tions/Effektorquotientenprofilen. Ferner betrifft die vorlie-  
gende Erfindung ein Messinstrument zur Durchführung der  
genannten Verfahren.

Das Vorkommen von Lipiden/Eicosanoiden im menschlichen Körper  
und ihre Bedeutung für potentiell viele Körperfunktionen des  
Menschen wurde bereits vor über 100 Jahren beschrieben. Ihre  
Biosynthese sowie deren Beeinflussung durch komplexe als auch  
reine chemische Verbindungen ist bereits seit dem Altertum  
bekannt (z.B. die schmerzlindernde Wirkung des Bruchweiden-  
extraktes) und wurde biochemisch seit Mitte des 20. Jahrhun-  
derts immer detaillierter aufgeklärt (1-15). Aber auch das  
Vorkommen der Lipide/Eicosanoide und ihre einflussnehmende  
Wirkung im Tierreich (auch in Amphibien, Insekten und Mikro-  
organismen) und den Pflanzen ist bekannt (16-19). Weiterhin  
wachsen die Erkenntnisse über die verschiedenen Lipid/Eico-  
sanoidrezeptoren und möglicher Subtypen zunehmend. Auch sind  
z.T. die Gene und ihre chromosomalen Lokalisationen für ei-  
nige Enzyme des Eicosanoidmetabolismus und der Eicosanoidre-  
zeptoren bekannt (20-26).

Der Nachweis von Lipiden/Eicosanoiden erfolgt zur Zeit mit-  
tels verschiedener physikalisch-chemischer und immunologi-  
scher Techniken (z.B. durch Gaschromatographie, Hochdruck-

flüssigkeitschromatographie (HPLC), Dünnschichtchromatogra-  
phie, Radioimmunoassays (RIA), Enzymimmunoassays (EIA)).  
Diese Methoden unterscheiden sich hinsichtlich der Nach-  
weisempfindlichkeit und Auftrennmöglichkeit verschiedener Li-  
pide/Eicosanoide während des Messvorgangs sowie des maximalen  
5 Probendurchsatzvolumens (27).

Der Nachweis bzw. die Bestimmung von Enzymen, die an der Syn-  
these bzw. dem Abbau von Lipiden/Eicosanoiden beteiligt sind,  
10 erfolgt meist nach gelelektrophoretischer Auftrennung der  
zellulären Proteine durch anschließende Markierung mittels  
spezifischer Antikörper oder auf intakten Zellen mit radioak-  
tiv oder anderweitig markierten Lipiden/Eicosanoiden bzw. Re-  
zeptorliganden (Agonisten/Antagonisten). Auch ist ein immu-  
15 cytologischer Nachweis der Enzyme bzw. Rezeptoren mittels im-  
muncytologischer Methoden unter Verwendung geeigneter mo-  
noklonaler oder polyklonaler Antikörper möglich. Enzymatische  
Aktivitätsnachweise bzw. -bestimmungen erfolgen direkt durch  
Messung des Abbaus geeigneter Enzymsubstrate oder indirekt  
20 durch den Nachweis sekundär gebildeter Metaboliten  
(20,21,24,37,29-30).

Der Nachweis bzw. die Bestimmung von mRNA für die Enzyme und  
Rezeptoren, die an der Synthese bzw. dem Abbau von Lipi-  
den/Eicosanoiden oder an deren Bindung beteiligt sind, kann  
25 z.B. mittels RT-PCR (engl. »reverse transcriptase polymerase  
chain reaction«) oder »northern blotting« erfolgen.

Die Lipide/Eicosanoide wurden bisher für klinisch-diagnosti-  
sche Zwecke nicht bzw. nicht in breitem Umfang genutzt  
30 (31,32), obwohl Analyseverfahren zur Gesamtbestimmung oder  
auch zur selektiven Bestimmung von bestimmten Eicosanoiden  
bekannt sind (21-30). Nur für einzelne Eicosanoide, die Pep-  
tid-Leukotriene, befindet sich ein Testsystem auf dem Markt

(»CAST-Elisa«), das zum Nachweis erhöhter Peptid-Leukotrien-  
spiegel nach in-vitro-Stimulation mit Allergenen in Kombina-  
tion mit generell zellaktivierenden Substanzen (z.B. Komple-  
mentfaktoren oder Cytokinen) dient. Aus der Menge der freige-  
setzten Lipide/Eicosanoide, d.h. der Peptid-Leukotriene, soll  
der Grad der Sensibilisierung der untersuchten (allergischen)  
Patienten abzuleiten sein (32). Auch über die Veränderung der  
Lipid/Eicosanoidspiegel bei verschiedenen Krankheitsbildern  
ist berichtet worden (33-37).

Die verschiedenen Autoren weisen in ihren Arbeiten auf die  
Messbarkeit von veränderten Lipid/Eicosanoidmengen in den von  
ihnen untersuchten Proben hin, und dass viele der untersuch-  
ten Krankheitsbilder mit erhöhten Lipid/Eicosanoidspiegeln  
einhergehen. Grundsätzlich wird aber nicht auf ein Lipid/Ei-  
cosanoidmuster oder -profil, welches sich gegenüber einem  
Normalzustand verändert hat, eingegangen. Auch wird meist nur  
der Ist-Zustand von Lipiden/Eicosanoiden bestimmt. Es wird  
jedoch nicht z.B. die Auswirkung einer Modulation (Stimula-  
tion/Inhibition) der Eicosanoidsynthese des biologischen  
Materials in vitro für diagnostische Zwecke in Erwägung  
gezogen (mit Ausnahme des bereits erwähnten CAST-ELISA).  
Enzyme und Rezeptoren des Lipid/Eicosanoidstoffwechsels  
wurden nach bisherigem Wissensstand nicht für diagnostische  
Zwecke, weder im Ist-Zustand noch im modulierten Zustand,  
herangezogen.

Aus diesem Stand der Technik ergibt sich die Aufgabe der Er-  
findung.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Sicherung oder  
zum Ausschluss von Krankheitszuständen oder Prädispositionen  
dafür auf der Grundlage von Lipidmessparameter-Modulati-  
ons/Effektorquotientenprofilen, bei dem

Schäfer/Baenkler  
Case 139WO

- (a) eine Probe aus einem zu untersuchenden Organismus entnommen wird,
- 5 (b) die Probe aus dem zu untersuchenden Organismus in so viele gleiche Teilproben aufgeteilt wird, dass für jeden Lipidmessparameter (eine Definition dieses Begriffs wird weiter unten gegeben) A, B, C ... ein Nullwert  $A_0$ ,  $B_0$ ,  $C_0$ , ... in Abwesenheit eines modulierenden Effektors (bzw. Mediators); ein Wert für eine Leitsubstanz (Leitwert)  $A_{max}$ ,  $B_{max}$ ,  $C_{max}$ , ... in Gegenwart eines modulierenden Effektors (bzw. Mediators) (Leitwert, da es auch 10 Fälle gibt (z.B. bei Verwendung eines chemotaktischen Peptids, wie fMLP, N-Formyl-met-Leu-Phe-Phe), bei denen der Messwert für den weiteren modulierenden Effektor (wie im folgenden angegeben) höher ist als der »Leitwert«); und mindestens ein Wert für eine weitere (in der Regel (aus den oben erläuterten Gründen) intermediäre, d.h. sich unter oder zwischen dem Nullwert und dem Leitwert befindliche) Modulation  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$ , ... in Gegenwart 20 eines weiteren modulierenden Effektors (bzw. Mediators) gemessen werden kann,
- 25 (c) für jeden Lipidmessparameter A, B, C, ... der Probe aus dem zu untersuchenden Organismus
- 30 (i) die Quotienten der Messwerte  $A_{max}/A_0$ ,  $A_2/A_0$ ;  $B_{max}/B_0$ ,  $B_2/B_0$ ;  $C_{max}/C_0$ ,  $C_2/C_0$ ; ... gebildet und anschließend die für den zu untersuchenden Organismus erhaltenen Werte durch die entsprechenden Werte einer oder mehrerer Normgruppe(n) dividiert werden, wodurch sich normierte Modulationsquotienten ergeben, die in ihrer Gesamtheit ein normiertes Modulationsquotientenprofil für den zu untersuchenden Organismus bilden, und



(ii) aus den Nullwerten  $A_0$ ,  $B_0$ ,  $C_0$  ... Quotienten  $A_0/B_0$ ,  $B_0/A_0$ ,  $A_0/C_0$ ,  $C_0/A_0$ ,  $B_0/C_0$ ,  $C_0/B_0$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; aus den Werten für eine maximale Modulation mit einer Leitsubstanz  $A_{\max}$ ,  $B_{\max}$ ,  $C_{\max}$  ... Quotienten  $A_{\max}/B_{\max}$ ,  $B_{\max}/A_{\max}$ ,  $A_{\max}/C_{\max}$ ,  $C_{\max}/A_{\max}$ ,  $B_{\max}/C_{\max}$ ,  $C_{\max}/B_{\max}$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; und aus den Werten für mindestens eine weitere Modulation  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$  ... Quotienten  $A_2/B_2$ ,  $B_2/A_2$ ,  $A_2/C_2$ ,  $C_2/A_2$ ,  $B_2/C_2$ ,  $C_2/B_2$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; und anschließend die für den zu untersuchenden Organismus erhaltenen Werte durch die entsprechenden Werte einer oder mehrerer Normgruppe(n) dividiert werden, wodurch sich normierte Effektorquotienten ergeben, die in ihrer Gesamtheit ein normiertes Effektorquotientenprofil für den zu untersuchenden Organismus bilden,

und

(d) eine Risikokonstellation, ein Krankheitszustand oder eine Prädispositionen dafür durch den Vergleich der normierten Modulations- und Effektorquotientenprofile des zu untersuchenden Organismus mit denen einer entsprechenden Untersuchungsgruppe, bei der die interessierende Risikokonstellation, der interessierende Krankheitszustand oder die interessierende Prädisposition vorliegt, diagnostiziert wird.

Es ist klar, dass bei der Berechnung der Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotienten die Fehlerfortpflanzung berücksichtigt wird. Ferner lässt sich grob sagen, dass ein Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotient auffällig ist, wenn er etwa 5 - 10 % höher oder niedriger als der jeweilige

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Normwert ist. Als weiteres Entscheidungskriterium zur Abgrenzung Normal/Auffällig kann auch die zweifache Standardabweichung  $2\sigma$  des jeweiligen normalen Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotienten dienen. Ist der betreffende Wert gegenüber dem Normwert  $\pm 2\sigma$  verändert, wird er als auffällig angesehen.

Es ist klar, dass der Begriff »Normgruppe« bzw. »Untersuchungsgruppe« relativ ist. Die »Normgruppe« kann auch durch den zu untersuchenden einzelnen Organismus selber oder durch Teile desselben (z.B. Gewebe, Körperflüssigkeiten) gebildet werden, z.B. wenn Messwerte im gesunden Zustand später zur Normierung von Messwerten in einem akuten Krankheitszustand verwendet werden, oder auch einfach nur um festzustellen, ob irgendwelche Veränderungen eingetreten sind. In analoger Weise gilt dies auch für die »Untersuchungsgruppe«, z.B. wenn Werte im akuten Krankheitszustand nach erfolgter Therapie mit dem Ist-Zustand verglichen werden. Es ist ferner klar, dass die Messwerte für die Normgruppen und die Untersuchungsgruppen oder die Messwerte auch nur für einen zu untersuchenden einzelnen Organismus im Normalzustand bzw. im Zustand akuter Erkrankung auch in einer Datenbank gespeichert und bei Bedarf abgerufen und zur Normierung bzw. zum Vergleich herangezogen werden können. Sollten derartige Messwerte nicht vorliegen, können sie ohne weiteres unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens in entsprechenden »normalen« und »pathologischen« Zuständen oder mit entsprechenden »Normgruppen« und »Untersuchungsgruppen« erhoben werden.

Die Bestimmung von Lipidmessparametern erfolgte bisher nahezu ausschließlich für einzelne Fragestellungen und meist ohne klinisch-diagnostischen Bezug. Sofern überhaupt eine diagnostische Fragestellung besteht (z.B. beim »CAST-ELISA« der Fa. Bühlmann-Laboratories), wird aber nur ein Lipidmessparameter

(hier die Peptid-Leukotriene) bestimmt oder z.B. nur die Grundmenge an Eicosanoid 1 und 2 und evtl. 3 oder Enzym 1 und 2 etc. oder die Synthese von Eicosanoid 1 erfasst (32). Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird hingegen insbesondere das Verhältnis verschiedener Lipidmessparameter zueinander bestimmt (sog. Balancen) und klinisch-diagnostisch ausgewertet, die zu einer Einstufung in Risikokonstellationen führt.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotientenprofile ermöglichen die Differenzierung von Krankheitsbildern, das »Monitoring« von Therapien, die Abschätzung von anti-inflammatorischen/pro-inflammatorischen Effekten von Stoffen, Substanzen bzw. Materialien und letztlich auch die inflammatorische Risikoabschätzung bekannter und unbekannter Stoffe/Stoffgruppen in vitro. Mit Hilfe neuer Technologien (Micro-Multi-Array-Techniken) könnten nunmehr auch kleinste Probenmengen nach dem geschilderten Verfahren analysiert und daraus wichtige Rückschlüsse gezogen werden.

Wie bereits erwähnt, können erfindungsgemäß verschiedene Krankheitsbilder aufgrund der für sie jeweils charakteristischen Lipidverhältnisse diagnostiziert bzw. charakterisiert werden.

So kann z.B. der Verlauf einer Desensibilisierung gegen Allergene oder eine Desaktivierung gegenüber Acetylsalicylsäure (Aspirin®) direkt gemessen werden, ohne das Wohl des Patienten zu beeinträchtigen. Sowohl die Modulation als auch die Messung finden ex-vivo statt. Eine Messung in vivo ist nicht nötig. Gegenüber dem Stand der Technik beruht das erfindungsgemäße Verfahren auf der Informationsgewinnung durch den Vergleich mindestens zweier Lipidmessparameter im modulierten (stimulierten/inhibierten) und unmoduliertem

Zustand. Eine Risikokonstellation kann nicht über einen Lipidmessparameter alleine zuverlässig bestimmt werden (beim CAST-ELISA (32) wird z.B. nur 1 Lipidmessparameter bestimmt), sondern nur durch die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotientenprofile, die z.B. das Verhältnis von z.B. Prostaglandinen zu Leukotrienen berücksichtigen.

Weitere vorteilhafte oder bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

Nach einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (b) die Lipidmessparameter unter Messparametern für ungesättigte Fettsäuren, Abbau- und Syntheseeenzyme für ungesättigte Fettsäuren sowie dafür kodierende Nukleinsäuren (mRNA), und unter solchen für Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren sowie dafür kodierende Nukleinsäuren (mRNA) ausgewählt.

Beispielsweise werden die ungesättigten Fettsäuren unter dem Thrombozyten-aktivierenden Faktor (= PAF, engl. »platelet activating factor«) (12) und den Eicosanoiden, z.B. Peptid-Leukotrienen (= pLTs, z.B. LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Thromboxan A<sub>2</sub> und Thromboxan B<sub>2</sub> (= TXB<sub>2</sub>), ausgewählt.

Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in dem oben definierten Schritt (b) als maximal modulierender Effektor (Leitsubstanz) Arachidonsäure oder ein chemotaktisches Peptid wie z.B. fMLP verwendet.

Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in dem oben definierten Schritt (b) als weiterer modulierender Effektor ein Stoff (z.B. Viren, Bakterien oder andere Organismen wie Hefen, Pilze oder Bestandteile

davon, Chemikalien im weitesten Sinne wie Lösungsmittel oder Farbstoffe, Allergene im weitesten Sinne, insbesondere auch biologischen Ursprungs, Arzneimittel, Toxine, insbesondere auch biologischen Ursprungs) verwendet, der einen auffälligen Zustand, z.B. einen Krankheitszustand, hervorrufen kann oder an dessen Entstehung oder Entwicklung beteiligt ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich beispielsweise zur Diagnose bzw. zur Sicherung oder zum Ausschluss der folgenden Krankheitszustände sowie zur Abschätzung einer Prädisposition für dieselben: Tumore, beispielsweise bronchiale Tumore, cystische Fibrose, Polyposis, z.B. Polyposis nasi et sinuum, Asthma bronchiale, Unverträglichkeiten/Intoleranz gegen Nahrungsmittel, Nahrungsmittelzusatzstoffe oder Arzneimittel, z.B. gegen Analgetika wie Acetylsalicylsäure (Aspirin®), Allergien wie Pollen-, Sporen-, Milben-, Wespen- und/oder Bienengiftallergie, etwa als allergisches Asthma, unterschiedliche Entzündungen wie Enzephalitis, Sinusitis, Rhinitis, Neurodermitis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Diarrhöen, Infektbewältigung, z.B. an Schleimhäuten, z.B. zur Abwehr bakterieller, viraler oder mykotischer Elemente, z.B. bei bakterieller, viraler oder mykotischer Mucositis, bei Infektanfälligkeit, Gerinnungsstörungen, z.B. Thrombosen, Blutungen oder Thrombophilie.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Krankheitszustände betreffen den Magen-Darm-Trakt. Es ist beispielsweise bekannt, dass die Inzidenz bei entzündlichen Darmerkrankungen bei 5-10/100.000 liegt, wobei die Prävalenz mit 100/100.000 angegeben wird. Interessanterweise sind Kaukasier häufiger betroffen als Negroide oder Hispanier. Zu den diskutierten Risikofaktoren zählen die Nahrung sowie Nahrungsinhalts- sowie -zusatzstoffe, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Bis zu 70% der im Blut zirkulierenden Granulozyten passieren

innerhalb von 48 Stunden das Darmepithel und können so in direkten Kontakt mit Nahrungsalergenen geraten.

Auf dem Gebiet der Nahrungsmittelunverträglichkeiten sind insbesondere die folgenden Organe betroffen: Haut (ca. 40%), Atemwege (ca. 23%), Gastrointestinaltrakt (ca. 20%). Gelegentlich gehen diese Unverträglichkeiten einher mit Beeinträchtigungen des Herz-Kreislauf-Systems (ca. 10%), mit leichten Schockzuständen bis hin zum anaphylaktischen Schock, sowie mit Migräne als auch mit bestimmten Verhaltensstörungen wie dem „hyperkinetischen Syndrom“. Ein signifikanter Teil der Bevölkerung leidet unter Nahrungsmittelunverträglichkeiten.

Ferner ist bekannt, dass Schleimhautulzerationen des Gastrointestinaltraktes mikroskopisch in der Regel keinen Rückschluss auf eine spezielle Genese zulassen. Auch histologische Befunde ermöglichen bei fehlendem Vorliegen eines eindeutigen Nachweises bestimmter Erreger oder beim Fehlen des Nachweises von Tumormarkern keine klare Diagnosestellung. In manchen Fällen können dann entzündliche, toxische oder allergische Reaktionen zu Grunde liegen. Eine Durchführung üblicher Untersuchungsmethoden wie z.B. Pricktestung oder die Verordnung einer allergischen Diät als Primärdiagnostik liefern jedoch häufig nur eine geringe Spezifität oder Sensitivität oder beides. Die erfindungsgemäß vorgeschlagene Bestimmung eines Eicosanoid-Profiles führt hier zu einer eindeutig verbesserten Abklärung der Krankheitssituation. Untersuchungen an Blutzellen von Patienten mit einer Nahrungsmittelunverträglichkeit ergaben beispielsweise, dass aus einer umfangreichen Anzahl von potentiell verursachenden Nahrungsmitteln, die zuvor im Pricktest negative Ergebnisse erbracht hatten, unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens durch die in vitro durchgeführte Provokation der Zellen mit

diesen Stoffen tatsächliche Verursacher identifiziert werden konnten. Die erfindungsgemäß herbeigeführte Kenntnis dieser verursachenden Substanzen führte durch Weglassen dieser Stoffe im Rahmen einer entsprechend veranlassten Diät zu einer deutlichen Besserung der klinischen Symptome, womit die erfolgreiche Erstellung einer Risikokonstellation anhand des erfindungsgemäßen Verfahrens eindrucksvoll bestätigt werden konnte.

Auf dem Gebiet der Magen-Darm-Geschwüre (gastrointestinale Ulcera) haben endoskopische Untersuchungen an Patienten, die nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAD's) einnehmen, eine Prävalenz von 15-30% ergeben. Intestinale Komplikationen mit klinischer Relevanz wurden bei 2% beobachtet. Die Beteiligung von Eicosanoiden an diesen Krankheitsbildern wurde in der Literatur häufig beschrieben. Insbesondere die Unverträglichkeit von NSAD's - möglicherweise beruhend auf einer Unausgewogenheit der Eicosanoide - ist sehr häufig verbreitet und angesichts von 1000-2000 Todesfällen/Jahr in England/UK bzw. von 2000-16000 Fällen in den USA als lebensbedrohlich zu bezeichnen. Das Potential der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens auf die Untersuchung von Biopsien und/oder isolierten Blutzellen liegt daher auf der Hand. Eigene Untersuchungen zeigten beispielsweise, dass Patienten mit Ulcera Lipidmessparameter aufwiesen, die im Sinne einer Risikokonstellation als auffällig zu bezeichnen waren. Da bei einer Reihe von Entzündungsprozessen eine Infiltration mit Entzündungszellen beobachtet wurde liegt die Vermutung nahe, dass diese Entzündungszellen - wozu auch Zellen des Blutes gehören - die erfindungsgemäß gemessenen Lipidmediatoren freisetzen und zur Schädigung der intestinalen Mucosa beitragen.



Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist daher die Anwendung des vorliegenden Verfahrens zur Diagnose bzw. Analyse von entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen oder Veränderungen des Magen-Darm-Traktes.

5 Nach einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird/werden zur Bestimmung der Lipidmessparameter ein oder mehrere, gegebenenfalls markierte(s) Eicosanoid(e) oder der Farbstoff 9-Diethylamino-5H-benzo[alpha]phenoxazin-5-on (38-  
10 40) verwendet.

Nach einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zur Bestimmung der Lipidmessparameter immobilisierte Sonden verwendet, die ausgewählt sind unter: Antikörpern oder  
15 funktionellen Fragmenten davon gegen Abbau- oder Syntheseeenzyme von ungesättigten Fettsäuren oder gegen Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren; Nukleinsäuren, die an Nukleinsäuren hybridisieren, die für Abbau- oder Syntheseeenzyme von ungesättigten Fettsäuren oder für Rezeptoren für ungesättigte  
20 Fettsäuren kodieren.

Eine Sonde ist ganz allgemein ein Erkennungsmolekül oder ein Rezeptor, das/der einen Liganden spezifisch erkennen und binden kann.

25 Unter einem »funktionellen« Fragment eines Antikörpers wird ein Antikörperfragment verstanden, das an ein Antigen binden kann, das aber nicht notwendigerweise auch immunogen sein muss.

30 Geeignete Antikörper werden unter polyklonalen, monoklonalen und Single-chain-Antikörpern ausgewählt.

Geeignete Nukleinsäuren werden unter cDNA, mRNA und Oligonukleotiden ausgewählt.

Vorzugsweise bilden die immobilisierten Sonden ein adressierbares Muster auf einer Oberfläche, wodurch ein sogenannter Biochip entsteht.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Überwachung des Verlaufs von Therapien von auffälligen Zuständen (z.B. Krankheitszuständen) auf der Grundlage von Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem das oben definierte erfindungsgemäße Verfahren nach der Verabreichung/Applikation (d.h. das zu untersuchende Medikament wird den Probanden bzw. dem Organismus vor der Probennahme verabreicht) oder in Gegenwart (d.h. das zu untersuchende Medikament wird der Probe nach deren Entnahme aus dem Probanden bzw. Organismus zugesetzt) eines geeigneten Medikaments durchgeführt wird. Dieses Medikament kann als einer der »weiteren modulierenden Effektoren« im Sinne der Erfindung angesehen werden. Es können natürlich auch Medikamentenkombinationen verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum Auffinden von Wirkstoffen zur Behandlung von Krankheitszuständen auf der Grundlage von Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem das oben definierte erfindungsgemäße Verfahren nach der Verabreichung (d.h. der zu untersuchende Kandidatenwirkstoff wird dem Probanden/Organismus vor der Probennahme verabreicht) oder in Gegenwart (d.h. der zu untersuchende Kandidatenwirkstoff wird der Probe nach deren Entnahme aus dem Probanden/Organismus zugesetzt) eines geeigneten Kandidatenwirkstoff durchgeführt wird. Dieser Kandidatenwirkstoff kann als einer der »weiteren modulierenden Effektoren« im Sinne der Erfindung angesehen werden. Es

können natürlich auch Kandidatenwirkstoffkombinationen verwendet werden.

5 Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zum Auffinden von Stoffen, die in der Lage sind, einen oben definierten Krankheitszustand auszulösen, auf der Grundlage von Lipid-

10 messparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem das oben definierte erfindungsgemäße Verfahren nach der Verabreichung/Applikation (d.h. der zu untersuchende Stoff wird dem Probanden/Organismus vor der Probennahme verabreicht/appliziert) oder in Gegenwart (d.h. der zu untersuchende Stoff wird der Probe nach deren Entnahme aus dem Probanden/Organismus zugesetzt) eines solchen Stoffes durchgeführt wird.

15 Die Erfindung betrifft ferner ein Messinstrument zur Durchführung der oben definierten erfindungsgemäßen Verfahren, das eine Oberfläche aufweist, auf der die oben definierten Sonden immobilisiert sind.

20 Vorzugsweise bilden die Sonden ein adressierbares Muster auf der Oberfläche, wodurch ein sog. Biochip entsteht.

25 Im folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung und unter Bezugnahme auf konkrete Beispiele detaillierter veranschaulicht.

30 Allgemein betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Diagnose bzw. zur Sicherung oder zum Ausschluss von auffälligen Zuständen z.B. Krankheitszuständen oder Prädispositionen dafür, sowie ein Verfahren zur Überwachung des Verlaufs von Therapien und zum Auffinden von Wirkstoffen zur Behandlung von auffälligen Zuständen z.B. Krankheitszuständen, das auf der Ermittlung des spontanen, allgemein modulierbaren (d.h.

induzierbaren bzw. aktivierbaren/inhibierbaren) oder des  
speziell provozierten Verhaltens von Geweben und Zellen  
bezüglich der Synthese, Abgabe, Umsetzung oder des Abbaus von  
Lipiden wie Eicosanoiden, deren Rezeptoren oder  
5 Abbau/Syntheseenzyme, und zwar sowohl absolut als auch im  
gegenseitigen Verhältnis, beruht.

Im Gegensatz zum Stand der Technik wird nach dem erfindungs-  
gemäßen Verfahren zum einen der Grundzustand (der native,  
10 nicht modulierte Zustand, der dem Nullwert entspricht) und  
zum anderen der modulierte Zustand (z.B. bei Stimulation mit  
einer Leitsubstanz und mindestens einem weiteren Modulator)  
von Lipidmessparametern, z.B. der synthetisierten Lipi-  
de/Eicosanoide, der Enzyme der Lipid/Eicosanoidsynthese  
15 und/oder der Lipid/Eicosanoidrezeptoren, untersucht. Weiter-  
hin werden mindestens zwei verschiedene Lipidmessparameter  
bestimmt, z.B. Eicosanoide, Eicosanoidenzyme und/oder Eicosa-  
noid-Rezeptoren der selben Probe gleichzeitig analysiert.  
Hierdurch wird nicht der statische (Grund/Ist)-Zustand  
20 erfasst, sondern zusätzlich die Dynamik/Modulierbarkeit des  
zu untersuchenden Systems charakterisiert.

Solche »Balanced-Score«-Tests hinsichtlich anderer Parameter  
sind im Rahmen der medizinischen Diagnostik schon bekannt für  
25 die Bewertung des Immunstatus, z.B. bei der Ermittlung der  
Subpopulationen der T-Lymphozyten (Th1-Th2-Verhältnisse) bei  
Lepra- oder HIV-Patienten (41,42).

Die folgenden Definitionen für verwendete Begriffe gelten für  
30 die gesamte Erfindung und in jeder Kombination.

Lipide im Sinne der Erfindung sind beispielsweise gesättigte  
und insbesondere einfach sowie vorzugsweise mehrfach ungesät-  
tigte Fettsäuren natürlicher oder synthetischer Herkunft (mit

mind. 16 Kohlenstoffatomen, z.B. 20 Kohlenstoffatomen) sowie deren natürliche und chemisch/physikalisch/technisch induzierten Derivate und Konstrukte.

5 Derivate im Sinne der Erfindung (insbesondere in bezug auf die obigen Lipide) sind biologische/natürliche, chemisch induzierte, physikalisch induzierte/synthetisierte Abkömmlinge der Lipide. Diese können durch enzymatische und/oder nicht-  
10 Derivaten entstehen (z.B. Prostaglandin E1, Prostaglandin E2, Prostaglandin E3, Leukotriene, Leukotrien C4 - Leukotrien D4 - Leukotrien D4; HETE (= Hydroxyeicosatetraensäure), PAF (engl. »platelet activating factor« = Thrombozyten-aktivierender Faktor).

15 Konstrukte im Sinne der Erfindung (insbesondere in bezug auf die obigen Lipide) sind biologisch und/oder chemisch manipulierte Lipide und/oder Derivate unter Hinzufügung oder Entfernung von chemischen/physikalischen/biologischen Strukturen, also Konstrukte, die natürlicherweise nicht existent  
20 sind, sondern willentlich durch gerichtete und/oder ungerichtete Modifikation/Synthese in geeigneten Systemen erzeugt werden (z.B. Enzyminhibitoren, Enzymaktivatoren, insbesondere Inhibitoren und/oder Aktivatoren der Eicosanoidsynthese wie  
25 z.B. Manipulatoren der Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen, Rezeptor-Antagonisten, Rezeptor-Agonisten, aber auch für die Detektion geeignete Lipidkonstrukte, die z.B. mittels Fluorometer oder Luminometer oder Massendifferenzmessapparaturen nachgewiesen und bestimmt werden können).

30 Organismen im Sinne der Erfindung sind lebende und/oder nicht lebende vielzellige und/oder einzellige Lebensformen wie Menschen, Tiere, Pflanzen, Pilze, Bakterien und/oder Viren und funktionelle Einheiten dieser Lebensformen wie z.B. (aber

nicht erschöpfend) Organe, Gewebe, Zellverbände, Zellen, Zellbestandteile (z.B. Mitochondrien).

5 Proben im Sinne der Erfindung sind manipulierte oder nicht manipulierte Organismen und/oder Teile von/aus einem/mehreren Organismen mit oder ohne vorherige Manipulation des Organismus und/oder der abgegebenen Strukturen/Substanzen (Lipide), sowie Derivate und/oder Konstrukte des/der modulierten und/oder nicht modulierten Organismus/Strukturen/Substanzen  
10 (Lipide), die einer Analyse mit dem Ziel zugeführt werden, direkt oder indirekt mindestens zwei Lipidmessparameter zu erheben. Als weitere Proben können erfindungsgemäß Nukleinsäuren analysiert werden, die im Zusammenhang stehen mit der Regulation/Expression von Lipiden/Eicosanoiden, wie z.B. Synthese- und Abbauenzyme sowie Rezeptoren.  
15

Lipidmessparameter im Sinne der Erfindung sind qualitativ und/oder quantitativ bestimmbare Einheiten einer Probe (z.B. Lipidmengen, Eicosanoidmengen, Derivatmengen, Konstruktmengen, Enzymmengen, Rezeptormengen, Rezeptordichten, Enzymaktivitäten, Nukleinsäuremengen, Rezeptorbindungsstärken, Ligandenstabilitäten in einer Probe bzw. einem zu definierenden Umfeld).  
20

25 Ein Parameter im Sinne der Erfindung ist eine aus einem oder mehreren Lipidmessparametern abgeleitete Größe für eine direkte oder indirekte Beurteilung bzw. Beschreibung des Zustandes des Lipidverhältnisses der Probe des untersuchten Organismus, auch um daraus die Folgen für den untersuchten Organismus bzgl. dessen weiterer bzw. zu beginnender Modulation vorherzusagen.  
30

Enzyme im Sinne der Erfindung sind Substanzen, die geeignet sind, ein gegebenes Substrat in seiner chemischen/physikalischen

5 schen/biologischen Art zu verändern und/oder in chemische/physikalische/biologische Prozesse/Reaktionsabläufe einzugreifen, um dadurch die Substrate, insbesondere Lipide im Sinne der Erfindung zu verändern (z.B. Cyclooxygenasen, Lipooxygenasen, Monooxygenasen).

Substrate im Sinne der Erfindung sind Stoffe, die durch Enzyme in ihrer/ihren chemischen/physikalischen/biologischen Eigenschaft/en verändert werden können.

10 Rezeptoren im Sinne der Erfindung sind Strukturen, die Lipide, Derivate, Konstrukte aber auch Organismen bzw. Proben im Sinne der Erfindung reversibel und/oder irreversibel binden. Dies können natürlicherweise vorkommende Strukturen  
15 (z.B. Proteine) aber auch künstlich erzeugte Strukturen/Konstrukte sein, ohne dass sie eine biologische Funktion besitzen müssen (außer, dass sie Liganden binden). Rezeptoren binden Liganden, wobei die Rezeptoren dieselbe, gleiche und/oder ähnliche chemisch/physikalisch/biologisch Struktur  
20 aufweisen können wie Liganden (d.h. Prostaglandin E2 kann sowohl ein Ligand als auch ein Rezeptor sein, abhängig davon, wie es sich im biologischen Umfeld/im zu untersuchenden Organismus verhält). Ihre chemische/physikalische/biologische Struktur muss dabei nicht bekannt sein.

25 Liganden im Sinne der Erfindung sind Strukturen natürlicher und/oder chemisch/physikalisch/biologisch modifizierter natürlicher und/oder künstlich erzeugter Substanzen/Konstrukte, die geeignet sind, an Rezeptoren im Sinne der Erfindung zu  
30 binden, und können selber/gleicher/ähnlicher chemischer/physikalischer/biologischer Struktur sein wie die Rezeptoren (z.B. Proteine, Peptide, gesättigte/ungesättigte Fettsäuren und deren Derivate und/oder Konstrukte, Nukleinsäuren und/oder Nukleinsäurederivate/Nukleinsäurekonstrukte). Ihre che-

mische/physikalische/biologische Struktur muss dabei nicht bekannt sein.

5 Ein »Modulator« bzw. »Effektor« im Sinne der Erfindung ist allgemein ein Stoff oder eine Substanz bzw. Verbindung, die einen oder mehrere Lipidmessparameter im Sinne der Erfindung verändern kann, z.B. erniedrigen oder erhöhen. Ein Effektor kann also sowohl ein Inhibitor oder Aktivator bzw. ein Antagonist oder Agonist sein.

10 Allgemein umfasst das erfindungsgemäße Verfahren folgende Schritte:

- 15 (a) Entnahme einer festen, flüssigen oder gasförmigen Probe (z.B. Zellen, Gewebe, Flüssigkeit, Atem/Atemluft) aus einem Organismus (z.B. Mensch/Tier/Pflanze/Bakterium)
- 20 (b) Bestimmung der absoluten und relativen Mengen der Lipide/Eicosanoide und/oder z.B. der Regulatoren-/Effektoren (z.B. Enzyme/Rezeptoren) dieser Lipide/Eicosanoide
- 25 (c) Bestimmung dieser Lipide/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren im nativen (unmodulierten) und/oder modulierten (stimulierten/inhibierten) Zustand
- 30 (d) Differenzierung einer Risikokonstellation (oder z.B. des Gesundheitszustandes/Krankheitszustandes oder einer Sicherung oder eines Ausschlusses bzw. Diagnose) anhand des Verhältnisses aus (a) bis (c) in Gruppen von Organismen/Patienten und/oder Individuen

sowie gegebenenfalls



(e) Erfassung und Bewertung des Lipid/Eicosanoid/Enzyme/Rezeptorenstatus des zu untersuchenden Organismus und Erfassung und Bewertung des Einflusses von therapeutischen Maßnahmen auf den Organismus (Therapiemonitoring in vitro)

(f) Erfassung und Bewertung (Risikokonstellation) des Einflusses der Lipide/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren auf komplexe andere Systeme, um Wechselwirkungen zu erkennen (z.B. Schadstoff-modulierte Bakterien oder Gräserpollen und deren Effekte auf die zu untersuchten Proben des zu untersuchenden Organismus)

Beispiel eines Flussdiagramms der Testdurchführung:

1. Probengewinnung
2. Probenaufbereitung
3. Probenexposition (modulierende Substanz/en)
4. Messprobengewinnung
5. Messprobenlagerung
6. Analytik (z.B. durch EIA (engl. »enzyme immuno assay«), RIA (engl. »radio-ligand immuno-sorbent assay«), FIA (engl. »fluorescence immuno assay«), HPLC (engl. »high pressure liquid chromatography«), GC (engl. »gas chromatography«), IH (engl. »immuno histochemistry/immonocytochemistry«), WB (engl. western blotting«), NB (engl. northern blotting«), SB (engl. southern blotting«), GE (engl. »gelelectrophoresis«), PCR (engl. »polymerase chain reaction«))
7. Lipidmessparametererfassung (semiquantitativ/quantitativ)
8. Messwertverrechnung
9. Aufstellen der Risikokonstellation (ggf. klinische Interpretation).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Das Lipid/Eicosanoidmuster bzw. -profil (verschiedene Lipide/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren) kann unter Verwendung beliebiger Proben (fest, flüssig, gasförmig) von einem beliebigen Organismus bestimmt werden, wobei die angewendete Mess-  
5 /Analysemmethode keinen besonderen Beschränkungen unterliegt und vom Fachmann nach Maßgabe der praktischen Gegebenheiten gewählt wird.

Die Proben können vor der Analyse nicht moduliert oder moduliert worden sein. Die Modulation kann z.B. erfolgen durch physikalische Mittel (z.B. Wärmestrahlung, radioaktive Strahlung), chemische Stoffe oder Substanzen (z.B. Enzyminhibitoren/-aktivatoren, Rezeptoragonisten/-antagonisten, spezifisch oder unspezifisch) oder biologische Stoffe oder Substanzen  
10 (z.B. Schimmelpilze, Baumpollen, Antikörper), die spezifisch oder unspezifisch auf das zu untersuchende System einwirken.  
15

Die Proben können sein/sich befinden in einer biologischen Matrix (Körperflüssigkeiten wie Serum, Plasma, Urin, Stuhl, Atemkondensat oder Liquor; Sekrete der Drüsen von Magen, Darm, Nase, Lunge, Augen; Zellhomogenate; Aerosole; eukaryotische und prokaryotische Zellen, Gewebeverbände und Gewebe) oder in definierten chemischen Lösungen (z.B. Zellkulturmedium, Puffer-/Salz-Lösungen, unphysiologische Lösungen, z.B.  
20 in Methanol).  
25

Die Analytik kann quantitativ oder semiquantitativ durchgeführt werden, sie ist jedoch stets geeignet zur Erfassung relativer Unterschiede der Lipide/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren/Nukleinsäuren entweder manipulierter Proben für einen dieser Parameter untereinander (z.B. unstimulierte Prostaglandin-E2-Synthese zu stimulierter und/oder inhibierter Prostaglandin-E2-Synthese) und/oder zur Erfassung relativer Unterschiede bestimmter im Einzelfall festzulegender Metabo-  
30

liten zueinander (z.B. Prostaglandin E2 zu Leukotrien D4 jeweils unmoduliert und moduliert).

Wesentlich ist, dass stets mehr als ein Lipidmessparameter (z.B. vor Behandlung/nach Behandlung oder unmoduliert/moduliert oder Eicosanoid 1/Eicosanoid 2 oder Enzym 1/Enzym 2, Rezeptor 1/Rezeptor 2, Eicosanoid 1/Rezeptor 1, Eicosanoid 1/Enzym 1, Rezeptor 1/Enzym 1, Rezeptor 1/Enzym 2, etc.) von derselben Probe ermittelt wird, die dann für die weitere Auswertung bereitstehen.

Die Lipide/Eicosanoide werden geeigneterweise z.B. mittels Enzym-Immuno-Assay-Technik erfasst, da mit dieser Technik viele Messproben am schnellsten und quantitativ gemessen werden können.

Erfasst werden z.B. Lipide/Eicosanoide (z.B. Leukotriene, Prostaglandine, Prostanoid, Hydroxyeicosatetraensäuren), Lipid/Eicosanoidrezeptoren, Enzyme der Lipid/Eicosanoidsynthese oder die entsprechenden Abbau- oder Regulationsenzyme, sowie dafür kodierende Nukleinsäuren (mRNA).

Zusätzlich zu den bereits bekannten, konventionellen Methoden (s.o.) soll hier ausdrücklich noch auf die Möglichkeit der Lipid/Eicosanoidanalytik mit Hilfe der Microarray- oder Biochiptechnik eingegangen werden. Die Biochip-Technologie ermöglicht die parallele semiquantitative und quantitative Bestimmung einer Vielzahl der oben genannten Lipidmessparameter, wobei die auf dem Biochip befindlichen Sonden zur Bestimmung der Lipid/Eicosanoidmessparameter thematisch (in Abhängigkeit von der Untersuchungsfragestellung) gruppiert sein können, oder aber auch entsprechend den gesuchten oder gegebenen Erfordernissen (z.B. abhängig vom Krankheitsbild; bei einem Krankheitsbild ist z.B. pLT und PGE2 wichtig, bei

5 einem anderen pLT und TXB2 oder PGE2 und TXB2 oder PGE2 und PGE2-Rezeptoren und/oder Cyclooxygenase-1) zusammenzustellen bzw. aufzubringen sind. Die physikalischen und/oder chemischen Techniken zur Herstellung von Biochips mit Hilfe bekannter Verfahren unterliegen dabei keinen besonderen Beschränkungen.

10 Die Visualisierung der nachzuweisenden bzw. zu bestimmenden Lipide/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren/Nukleinsäuren kann insbesondere mittels Fluorochromen oder phosphoreszierender oder bio-/chemolumineszierender oder chromogener Substanzen erfolgen.

15 Die Erfassung der Analysensignale kann z.B. mittels optischer und/oder elektronischer Messverfahren (z.B. Potentialänderungen, Leitfähigkeitänderungen) erfolgen.

20 Ziel der Erfindung ist die Bestimmung von Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, um auffällige Zustände (wie z.B. Krankheitsbilder) und Gesundheitszustände und somit Risikokonstellationen zu charakterisieren, oder z.B. nach anti-entzündlichen Stoffen bzw. Substanzen, z.B. Phytopharmaka, zu suchen (»Drugscreening«), oder um die inflammatorische Potenz bei der Bewertung der Biokompatibilität von implantierbaren Materialien (Produktsicherheit/Patientenschutz) oder die Veranlagung für bestimmte Erkrankungen (Risikokonstellationen) wie Gerinnungsstörungen (z.B. Thrombose, Lungenembolie), Magen-Darm-Erkrankungen (= intestinale Erkrankungen, z.B. Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Ulcus), Nahrungsmittelnunverträglichkeiten sowie Entzündungskrankheiten des Gehirns (z.B. Enzephalitis) abschätzen zu können. Weitere Anwendungsmöglichkeiten bestehen in der Geburtsheilkunde, z.B. zur Klärung der Fragestellung, ob

30

ein abnormaler Geburtsverlauf, z.B. wegen abnormaler Wehentätigkeit, zu erwarten ist.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher  
5 erläutert.

### Beispiel 1

10 Beispielhaft sei hier die Bestimmung des Grundzustandes sowie der stimulierten Zustände von Prostaglandin E2 und Peptid-Leukotrienen bei der Analgetika-Intoleranz geschildert.

15 Humane Leukozyten des peripheren Blutes werden mit Hilfe eines Dextrangradienten vom Plasma getrennt und auf eine definierte Zellzahl (100.000 Zellen/ml) eingestellt. Anschließend erfolgt die Stimulation durch Inkubation der Zellen, z.B. ohne oder unter Zusatz von Arachidonsäure als  
20 modulierende Leitsubstanz, oder anti-IgE als modulierender Effektor für eine definierte Zeit (30 Minuten) bei 37°C in Zellkulturmedium (z.B. RPMI 1640). Nach der Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten mit 800 x g bei 4°C wird der zellfreie Überstand gesammelt und kann gegebenenfalls bei -80°C unter Stickstoff oder Argon gelagert werden.  
25 Anschließend werden diese Messproben auf eine mit Prostaglandin E2 bzw. Peptid-Leukotrienen beschichtete Polystyrolplatte transferiert und für 18 Stunden bei 4°C unter Zugabe eines anti-Prostaglandin-E2- bzw. anti-Peptid-Leukotrien-Antikörpers inkubiert («kompetitiver Assay»). Nach einem Waschschritt erfolgt eine Inkubation bei 23°C für 2 Stunden mit  
30 einem gegen den ersten Antikörper gerichteten biotinylierten sekundären Antikörper. Nach erneutem Waschen wird mit einer Streptavidin-konjugierten Peroxidase bei 23°C für 1 Stunde inkubiert, und nach erneutem Waschen wird ein Peroxidase-

substrat hinzugegeben und nach ca. 30 Minuten die optische Dichte mittels eines Mehrkanal-Photometers bestimmt. Anhand der mitgeführten Standardkurven können nun die Messwerte quantitativ bestimmt und zur Berechnung der Lipidmessparameter-Stimulations/Effektorquotientenprofile verwendet werden (ein Beispiel für die Berechnung wird weiter unten gegeben).

Ein Beispiel beim Krankheitsbild der Analgetika-Intoleranz ist die verminderte basale Prostaglandin-E2-Synthese (um 20% und mehr), verbunden mit erhöhter basaler Peptid-Leukotrien-Synthese (20% und mehr). Der Quotient Peptid-Leukotrien / Prostaglandin E2 ist kleiner 10). Die Arachidonsäure-induzierte Prostaglandin-E2-Synthese ist unauffällig und die Arachidonsäure-induzierte Peptid-Leukotrien Synthese ist unauffällig bis leicht erhöht (0-40%), wenn diese Werte mit denen von unauffälligen Personen verglichen werden.

Erst die Ermittlung der Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotienten ermöglicht eine Differenzierung unterschiedlicher Eicosanoidmuster bzw. -profile, die verschiedenen Risikokonstellationen (wie z.B. bei Patienten mit Asthma bronchiale oder Polyposis nasi et sinuum oder Analgetika-induziertem Asthma) zugeordnet werden können.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung von Lipidmessparametern ist die fluorometrische Messung des Abbaus von ungesättigten Fettsäuren/Arachidonsäure, die mit dem Farbstoff 9-Diethylamino-5H-[ $\alpha$ ]phenoxazin-5-on (38) angefärbt werden. Der Farbstoff dringt in lebende Zellen ein und fluoresziert, solange er intrazellulär an ungesättigte Fettsäuren (d.h. solche mit 2 bis mehr Doppelbindungen) binden kann (39-40). Nach der Aktivierung der Zellen, z.B. durch LPS (Lipopolysaccharid) oder Interleukin-1, kommt es zur Aktivierung von Fettsäure-abbauenden Enzymen (z.B. Phospholipase A2(PLA)),

wodurch die Fluoreszenz abnimmt. Demgegenüber kann die Fluoreszenz auch erhöht sein, wenn z.B. endogene Arachidonsäure durch PLA aus Zellmembranen ins Cytoplasma freigesetzt wird, die Degradation derselben jedoch unterbleibt.

5

9-Diethylamino-5H-[alpha]phenoxazin-5-on wurde bisher lediglich für histologische/cytologische Untersuchungen verwendet, nicht jedoch für quantifizierende Experimente eingesetzt.

- 10 Bei Organismen mit veränderter Enzymausstattung kommt es nun zu einem veränderten Abbau der Fettsäuren (schneller oder langsamer), was durch eine Erfassung der Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten (Kinetik) quantitativ gemessen werden kann.

15

### Beispiel 2

- 100.000 Leukozyten/ml werden mit einer  $10^{-5}$  M Lösung von 9-Diethylamino-5H-[alpha]phenoxazin-5-on in PBS-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden sie 2 mal in PBS bei 4°C gewaschen und dann bei 600 x g zentrifugiert und anschließend in eine Reaktionsküvette überführt. Eine Probe wird nun ohne weitere Behandlung fluormetrisch vermessen (Anregungswellenlänge bei 485 nm, Emissionswellenlänge 570 nm). Eine weitere Probe wird z.B. mit LPS (5mg/ml) stimuliert und fluorometrisch vermessen. Die Fluoreszenz bei der Proben wird in Zeitabständen von 1 Minute bis zu einer Dauer von 60 Minuten erfasst. Anschließend kann aus den erhaltenen Werten der Anstieg und der Abfall der Fluoreszenz graphisch aufgetragen werden und die Steigungen der Kurven mittels geeigneter mathematischer Formeln ermittelt werden.



Während der ersten 5-10 Minuten kommt es bei den nicht behandelten Proben zu einem 0-5%igen Anstieg der Fluoreszenz, danach zu einer sigmoidal fallenden Fluoreszenz auf 40-60% des Ausgangswertes nach 60 Minuten. Bei den mit LPS-behandelten Proben kommt es innerhalb von 5-10 min zu einem 5-20%igen Anstieg der Fluoreszenz und zu einem 30-80%igen sigmoidalen Abfall der Fluoreszenz nach 60 Minuten.

Mit den so erhaltenen Werten können nun normierte Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotienten erhoben bzw. berechnet und die erhaltenen Profile mit denen von Proben von Referenz-Organismen verglichen werden. Sofern bereits Archivdaten aus vorherigen Untersuchungen vorliegen, können diese verwendet werden.

Durch den Vergleich können dann Risikokonstellationen für den untersuchten Organismus, z.B. hinsichtlich seiner Fähigkeit, ungesättigte Fettsäuren zu metabolisieren, ermittelt werden. Daraus lassen sich dann weitere therapeutische Maßnahmen ableiten.

Diese Methode kann nur in vitro eingesetzt werden. Bisher war eine Anwendung von 9-Diethylamino-5H-[alpha]phenoxazin-5-on für quantitative Bestimmungen des nativen und induzierten Abbaus von ungesättigten Fettsäuren/Arachidonsäure zur Bestimmung von Risikokonstellationen noch nicht bekannt.

Es folgt ein konkretes Berechnungsbeispiel für normierte Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotienten. Es wird nochmals darauf hingewiesen, dass die Bestimmung von Messwerten für eine Normgruppe entfallen kann, wenn bereits entsprechende Archivdaten vorliegen.

## Beispiel 3

1) Gewinnung von Leukozyten aus dem peripheren Blut von Untersuchungs-Gruppe 1 / Normgruppe/Untersuchungs-Gruppe 2  
5 mittels Blutabnahme und anschließender Dichtegradientenseparation (3%ige Dextran-Lösung) zur Abtrennung von Plasma und Leukozyten. Die so gewonnenen Leukozyten werden 3 x mit Phosphatpuffer-Lösung (PBS) gewaschen und anschließend in Zellkulturmedium (RPMI 1650) aufgenommen / resuspendiert, worauf  
10 eine Zellzahlkonzentration von 100.000 Zellen/ml eingestellt wird (nur bei diesem Beispiel Untersuchungs-Gruppe 2; eine zweite Gruppe ist für den Test vom Prinzip her nicht notwendig, diese dient hier nur zum besseren Verständnis und als zweite Vergleichsgruppe, und zwar zum einen zur Normgruppe  
15 und zum anderen zur Untersuchungs-Gruppe).

2) die Zellen werden zu 3 gleichen Teilen (z.B. 3 x je 1 ml Zellsuspension mit 100.000 Zellen/ml) in Reaktionsgefäße (z.B. Kunststoff- oder Glasgefäße) verteilt.

20 Die erste Teilprobe wird mit einer Kontroll-Lösung versetzt (= ohne weiteren Modulator, = Null- oder Leerwert; Kontroll-Lösung ist das Lösungsmittel, in dem die Modulatoren gelöst werden).

25 Die zweite Teilprobe wird mit Arachidonsäure versetzt (Konzentration:  $10^{-5}$  M; = Leitsubstanz).

30 Die dritte Teilprobe wird mit einer anti-Immunglobulin-E-Lösung (z.B. 1:100 Verdünnung der von der Fa. DAKO kommerziell erhältlichen anti-human-IgE-Lösung, = Modulator oder Modulationssubstanz) versetzt.

Der Beginn der Exposition / Inkubation mit der Leitsubstanz Arachidonsäure und dem Modulator anti-Immunglobulin-E-Lösung erfolgt zeitgleich bei z.B. 37°C für z.B. 30 Minuten.

- 5 Anschließend erfolgt eine Trennung der Zellen vom Zellkulturmedium, z.B. durch Zentrifugation bei 4°C und einer Sedimentationsstärke von z.B. 800 x g. Anschließend wird der so erhaltene Überstand der 3 Teilproben, je Teilprobe getrennt, in geeigneten Gefäßen (z.B. Kryoröhrchen) gesammelt und bis  
10 zur Analyse mittels EIA bei z.B. -70°C gelagert.

- 3) In den Zellkulturüberständen der 3 Teilproben werden der Gehalt an Prostaglandin E2 (PGE2) und Peptid-Leukotrienen (pLT) mittels enzymimmunologischer Assays (Nachweisverfahren)  
15 (EIA), die spezifisch für PGE2 (= Lipidmessparameter A) oder pLT (= Lipidmessparameter B) sind, analysiert und quantifiziert.

- Aus der ersten Teilprobe erhält man die Werte  $A_0$  (z.B. 350  
20  $\pm 43$  pg/ml PGE2) und  $B_0$  (z.B. 120  $\pm 9,7$  pg/ml pLT), aus der zweiten Teilprobe erhält man die Werte  $A_{\max}$  (z.B. 4120  $\pm 236$  pg/ml PGE2) und  $B_{\max}$  (z.B. 150  $\pm 10,4$  pg/ml pLT), aus der dritten Teilprobe erhält man die Werte  $A_2$  (z.B. 1830  $\pm 143,8$  pg/ml PGE2) und  $B_2$  (z.B. 83  $\pm 5,7$  pg/ml pLT).

25

Tabelle 1: Messwerte (in pg/ml):

Messparameter	Norm-Gruppe (N)	Untersuchungs- Gruppe 1 (U1)	Untersuchungs- Gruppe 2 (U2)
$A_0$	1820 $\pm$ 198	350 $\pm$ 43	2172 $\pm$ 207
$A_{\max}$	4170 $\pm$ 275	4120 $\pm$ 236	3976 $\pm$ 245
$A_2$	2975 $\pm$ 287	1830 $\pm$ 143	785 $\pm$ 69
$B_0$	23 $\pm$ 3,5	120 $\pm$ 9,7	54 $\pm$ 5,8
$B_{\max}$	143 $\pm$ 12,4	150 $\pm$ 10,4	128 $\pm$ 10,4
$B_2$	43 $\pm$ 5,7	83 $\pm$ 5,7	135 $\pm$ 12,7

4) Aus den so gewonnenen Werten der Teilproben erfolgt nun die Berechnung der Modulationsquotienten für den Lipidparameter A (= PGE<sub>2</sub>) und den Lipidparameter B (=pLT):

Tabelle 2: Modulationsquotienten:

Mess- parameter	Norm-Gruppe (n)	Untersuchungs- Gruppe 1 (u1)	Untersuchungs- Gruppe 2 (u2)
$A_{\max}/A_0$	2,3	11,8	1,8
$A_2/A_0$	1,6	5,2	0,4
$B_{\max}/B_0$	6,2	1,3	2,4
$B_2/B_0$	1,9	0,7	2,5

(auffällige Werte gegenüber der Kontrolle sind in der Tabelle 2 fett markiert)

Die Modulationsquotienten erlauben eine Unterscheidung der Untersuchungsgruppen (u1, u2) von der Normgruppe (n), nicht aber eine Differenzierung der Untersuchungsgruppen (u1, u2).

5) Normierung durch Division durch die entsprechenden Modulationsquotienten der Normalgruppe (n).

Tabelle 3: normierte Modulationsquotienten

Mess- parameter	Norm-Gruppe (n)	Untersuchungs- Gruppe 1 (u1)	Untersuchungs- Gruppe 2 (u2)
$A_{\max}/A_0$	1 (0,8-1,2)	5,1	0,78
$A_2/A_0$	1 (0,5-1,5)	3,3	0,25
$B_{\max}/B_0$	1 (0,5-1,2)	0,21	0,38
$B_2/B_0$	1 (0,5-1,2)	0,37	1,32

(auffällige Werte sind in der Tabelle 3 fett markiert)

Die normierten Modulationsquotienten erlauben ebenfalls nur eine Unterscheidung der Untersuchungsgruppen (u1, u2) von der Normgruppe (n), nicht aber eine Differenzierung der Untersuchungsgruppen (u1, u2). Die Differenzierung der Untersuchungs-Gruppen ist hier abhängig von der Normgruppe, d.h. es können auch zwei oder mehr sonst ähnliche Patienten-Gruppen differenziert werden, z.B. wenn eine »gesunde« Normgruppe nicht erstellt werden kann oder wenn geklärt werden soll, ob sich die beiden Untersuchungsgruppen unterscheiden.

6) Effektorquotienten (Berechnung wie oben)

Tabelle 4: Effektorquotienten (PGE/pLT):

Mess- parameter	Norm-Gruppe (n)	Untersuchungs- Gruppe 1 (u1)	Untersuchungs- Gruppe 2 (u2)
$A_0/B_0$	80,4	2,9	40,2
$A_{\max}/B_{\max}$	29,2	27,5	31,1
$A_2/B_2$	69,2	22,1	5,8

(auffällige Werte gegenüber der Kontrolle sind in der Tabelle 4 **fett** markiert)

Die Effektorquotienten erlauben die Differenzierung der beiden Untersuchungs-Gruppen (u1, u2) mit Hilfe des zweiten Modulators (= anti-IgE). Außerdem werden die Unterschiede der beiden Untersuchungs-Gruppen gegenüber der Normgruppe (n) deutlicher.

## 7) Normierte Effektorquotienten (Berechnung wie oben)

Tabelle 5: Normierte Effektorquotienten

Mess- parameter	Norm-Gruppe (n)	Untersuchungs- Gruppe 1 (u1)	Untersuchungs- Gruppe 2 (u2)
$A_0/B_0$	1 (0,5-1,2)	0,036	0,50
$A_{max}/B_{max}$	1 (0,9-1,1)	0,941	1,065
$A_2/B_2$	1 (0,2-1,2)	0,319	0,084

(auffällige Werte gegenüber der Kontrolle sind in der Tabelle  
5 fett markiert)

Die normierten Effektorquotienten ermöglichen die klare Differenzierung der beiden Untersuchungs-Gruppen (u1, u2) gegenüber der Normgruppe (n), sowie die Differenzierung der beiden Untersuchungs-Gruppen gegeneinander. Hier sind die angegebenen Werte bedingt abhängig von der gewählten Normgruppe, es könnte aber auch eine andere Normgruppe (n-x) gewählt werden. Dies kann z.B. erfolgen, um mehrere Untersuchungsgruppen (u1, u2, u3, u4) gegeneinander zu differenzieren. Wenn keine »Normgruppe« bereitsteht oder erstellt werden kann, kann eine Untersuchungsgruppe (u4) als »Normgruppe« (n-x) ausgewählt werden. Diese Alternative kann auch angewendet werden, wenn z.B. gegenüber »behandelter« (b1) und »anders behandelter« (b2) und/oder »unbehandelter« (b3 = n-x) Gruppe differenziert werden soll.

8) Anmerkung: Die Messwerte der pLT-Bestimmungen müssen gegebenenfalls mit einem »Ausgleichungsfaktor« (kann experimentell bestimmt werden und liegt zwischen 5 und 100) korrigiert werden, wodurch sich die daraus abgeleiteten/bestimmten Werte relational verändern würden.

## 9) Schlussfolgerungen aus den erhaltenen Ergebnissen:

Die Untersuchungsgruppe 2 wird in die Risikokonstellation 2 eingeteilt, d.h. es liegt eine Analgetika-Intoleranz ohne eine allergische Komponente vor, weshalb eine Desaktivierung gegenüber nichtsteroidalen Analgetika anzuraten ist, und nichtsteroidale Antiphlogistika sollten von Personen dieser Gruppe bis zur erfolgreichen Durchführung der Desaktivierung gemieden werden. Die Untersuchungsgruppe 1 wird der Risikokonstellation 1 zugeordnet, d.h. es liegt eine Analgetika-Intoleranz mit einer deutlichen allergisch-bedingten Komponente vor, weshalb bei Personen dieser Gruppe eine Allergie-Austestung vorgenommen werden sollte mit gegebenenfalls anschließender Desensibilisierung. Erst danach könnte eine Desaktivierung gegenüber Analgetika sinnvoll sein.

## LITERATUR

## 1) Hirschberg V.G.S.

Mitteilung über einen Fall von Nebenwirkungen des Aspirin.  
Dt Med Wochenschr 1902;28:416.

## 2) von Euler U.S.

Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des  
menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes.  
Klin Wschr 1935;14:1182-1186.

## 3) Hanahan D.J.

Platelet activating factor: A biological active  
phosphoglyceride.  
Ann Rev Biochem 1986;55:483-509.

## 4) Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B.

Thromboxanes: a new group of biologically active compounds  
derived from prostaglandin endoperoxidase.  
Proc Natl Acad Sci USA 1975;72:2994-2998.

## 5) Vane J.R.

Inhibition of prostaglandin biosynthesis as a mechanism of  
action for aspirin-like drugs.  
Nature (New Biol) 1971;231:232-235.

## 6) Bergström S.

Prostaglandines: Members of a new hormonal system.  
Science 1967;157:382-390.

## 7) Samuelsson B.

Some recent advances in leukotriene research.  
Adv Exp Med Biol 1997;433:1-7.



8) Samuelsson B., Dahlen S.-E., Lindgren J.A. Rouzer C.A.,  
Serhan C.N.

Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and  
biological effects.

Science 1987;237:1171-1176.

9) Holzman J.Y.

Arachidonic acid metabolism.

Am Rev Respir Dis 1991; 143:188-203.

10) Smith W.L.

The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action.

Biochem J 1989; 259:315-324.

11) Fradin A., Zirrolli J.A., Macclouf J., Vausbinder L.,

HENSON P.M., Murphy R.C.

Platelet-activating factor and leukotriene biosynthesis in  
whole blood - a model for the study of transcellular  
arachidonic metabolism.

J Immunol 1989;143:3680-3685.

12) Smith D.L & Willis A.L.

A suggested shorthand nomenclature for the eicosanoids.

Lipids 1987;22:983-987.

13) Corey E.J., Niwa H., Falck J.R., Mioskowski C., Arai Y.,

Marfat A.

Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids.

Adv Prostaglandin Thromboxane Res 1980;6:19-25.

14) Willis A.L. & Smith D.L.

Metabolism of arachidonic acid.

in: The handbook of immunopharmacology. Lipid mediators, ed.:

Cunningham F.M., Academic Press, London, 1994:1-32.

Schäfer/Baenkler  
Case 139WO

36

15) Slater T.F. & McDonald-Gibson R.G.

Introduction to the eicosanoids.

in: Prostaglandins and related substances, eds.: Benedetto C,

McDonald-Gibson RG, Nigam S, Slater TF, IRL Press, Oxford,

1987:1-4.

16) Rowley A.F., Kuhn H., Schewe T.

Eicosanoids and related compounds in plants and animals.

PoPrinceton University Press, Princeton, 1998.

17) Stanley-Samuelson D.W..

Physiological role of prostaglandins and other eicosanoids in  
invertebrates.

Biol Bull 1987;173:92-109.

18) Bell M.V, Henderson R.J., Sargent J.R.

The role of polyunsaturated fatty acid in fish.

Comp Biochem Physiol 1986;85B:711-719.

19) Vick B.A.

Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway.

Chapter 5

in: Lipid metabolism in plants.

ed: Moore T.S.

CRC Press, Boca Raton 1993:167-191.

20) Dennis E.A.

Diversity of group types, regulation, and function of  
phospholipase A2.

J Biol Chem 1994;269:13057-13063.

21) Creminon C., Habib A., Macclouf J., Pradelles P., Grassi J.

Differential measurement of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase expression in human umbilical cells using specific immunometric enzyme immunoassays.

Biochem Biophys Acta 1995;1254:341-348.

22) O'Neil G.P. & Ford-Hutshinson A.W.

Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase 2 in human tissue.

FEBS Lett 1993;330:156-160.

23) Kennedy I., Coleman R.A., Humphrey P.P.A., Levy H.P., Lumley P.

Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification

Prostaglandins, 1982: 24:667-689.

24) DeWitt D.L & Meade E.A.

Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isoenzymes.

Arch Biochem Biophys 1993;306:94-102.

25) Gardiner P.J. Abram T.S. Tudhope S.R. Cuthbert N.J.

Norman P., Brink C.

Leukotriene receptors and their selective antagonists.

Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res 1994;2:49-61.

26) Hong J.L. & Lee L.-Y.

Cigarette smoke-induced bronchoconstriction: causative agents and role of thromboxane receptors.

J Appl Physiol 1995;78:2260-2266.

27) Coleman R.A., Smith W.L., Narumiya S.

Classification of the prostanoid receptors: properties,  
distribution, and structure of the receptors and their  
subtypes.

Pharmacol rev. 1994;46:205-229.

28) Taylor G.W. & Wellings R.

Measurements of fatty acids and their metabolites.

in: Lipid mediators

ed.: Cunningham F.M.

Academic Press, London 1994:33-60.

29) Kulmacz R.J., & Lands W.E.M.

Cyclooxygenase: Measurement, purification and properties.

in: Prostaglandins and related substances.

eds.: Benedetto C., McDonald-Gibson R.G., Nigam S., Slater  
T.F.

Oxford University Press, Oxford 1989:209-228.

30) Schewe T., Kühn H., Rapoport S.M.

Lipoxygenases: measurement, characterization, and properties.

in: Prostaglandins and related substances.

eds.: Benedetto C., McDonald-Gibson R.G., Nigam S., Slater  
T.F.

Oxford University Press, Oxford 1989:229-242.

31) Vilaseca J., Salas A., Guarner F., Rodriguez R.,  
Malagelada J.R.

Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis  
in the course of experimental inflammatory colitis.

Gastroenterology 1990;98:269-277.

Schäfer/Baenkler  
Case 139WO

32) De Weck A.L., Stadler B.M., Urwyler A., Wehner H.U.,  
Bühlmann R.P.

Cellular antigen stimulation test (CAST) - A new dimension in  
allergy diagnostics.

5 Allergy Clin Immunol News 1993;5:9-14.

33) Baenkler H.-W., Schäfer D., Rosemann W.

Eicosanoids from biopsies of normal and polyposis nasal  
mucosa.

10 Rhinology 1996;34:166-170.

34) Schäfer D., Lindenthal U., Wagner M., Bölskei P.L.,  
Baenkler H.W.

Effect of prostaglandin E2 on eicosanoid release by human  
15 bronchial biopsy specimens from normal and inflamed mucosa.  
Thorax 1996;51:919-932.

35) Sauer S.K., Schäfer D., Kress M., Reeh P.W.

Stimulated prostaglandin E2 from rat skin, in vitro.

20 Life Science 1998;62:2045-2055.

36) Schäfer D., Schmid M., Göde U., Baenkler H.-W.

Dynamics of eicosanoids in peripheral blood cells during  
bronchial provocation in aspirin-intolerant asthmatics.

25 Eur Respir J 1999; 13:638-646.

37) Westcott J.Y.

The measurement of leukotrienes in human fluids.

Clin Rev Allergy Immunol 1999;17:153-177.

30

38) Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D.

Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular  
lipid droplets.

J Cell Biol. 1985;100:965-973.

39) Dvorack A.M., Dvorak H.F., Peters S.P., Shulman E.S., Mac  
Glashan D.W., Pyne K., Harvey V.S., Galli S.J., Lichtenstein  
L.M.

5 Lipid bodies: cytoplasmatic organelles important to  
arachidonate metabolism in macrophages and mast cells.  
J Immunol 1983;131:2965-2976.

40) Weller P.F. & Dvorack A.M.

10 Arachidonic acid incorporation by cytoplasmatic lipid bodies  
of human eosinophils.  
Blood 1985;65:1269-1274.

41) Erdmann E.

15 Klinische Kardiologie.  
Springer Verlag, Berlin, 2000.

42) Adler G., Beglinger C., Müller-Lissner S., Schmigel W.

Klinische Gastroenterologie und Stoffwechsel.

20 Springer Verlag, Berlin, 2000.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose von Krankheitszuständen oder  
Prädispositionen dafür auf der Grundlage von Lipidmess-  
parameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem
  - (a) eine Probe aus einem zu untersuchenden Organismus  
entnommen wird,
  - (b) die Probe aus dem zu untersuchenden Organismus in so  
viele gleiche Teilproben aufgeteilt wird, dass für  
jeden Lipidmessparameter A, B, C ... ein Nullwert  $A_0$ ,  
 $B_0$ ,  $C_0$ , ... in Abwesenheit eines modulierenden Effek-  
tors; ein Wert für eine Leitsubstanz (Leitwert)  $A_{max}$ ,  
 $B_{max}$ ,  $C_{max}$ , ... in Gegenwart eines modulierenden Effek-  
tors/einer modulierenden Leitsubstanz; und mindestens  
ein Wert für einen weiteren Modulator  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$ , ...  
in Gegenwart eines weiteren modulierenden Effektors  
gemessen werden kann,
  - (c) für jeden Lipidmessparameter A, B, C, ... der Probe  
aus dem zu untersuchenden Organismus
    - (i) die Quotienten der Messwerte  $A_{max}/A_0$ ,  $A_2/A_0$ ;  
 $B_{max}/B_0$ ,  $B_2/B_0$ ;  $C_{max}/C_0$ ,  $C_2/C_0$ ; ... gebildet und an-  
schließend die für den zu untersuchenden  
Organismus erhaltenen Werte durch die entspre-  
chenden Werte einer oder mehrerer Normgruppe(n)  
dividiert werden, wodurch sich normierte  
Modulationsquotienten ergeben, die in ihrer  
Gesamtheit ein normiertes Modulationsquotienten-  
profil für den zu untersuchenden Organismus  
bilden, und

(ii) aus den Nullwerten  $A_0$ ,  $B_0$ ,  $C_0$  ... Quotienten  $A_0/B_0$ ,  $B_0/A_0$ ,  $A_0/C_0$ ,  $C_0/A_0$ ,  $B_0/C_0$ ,  $C_0/B_0$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; aus den Werten für eine Leitsubstanz  $A_{\max}$ ,  $B_{\max}$ ,  $C_{\max}$  ... Quotienten  $A_{\max}/B_{\max}$ ,  $B_{\max}/A_{\max}$ ,  $A_{\max}/C_{\max}$ ,  $C_{\max}/A_{\max}$ ,  $B_{\max}/C_{\max}$ ,  $C_{\max}/B_{\max}$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; und aus den Werten für mindestens eine weitere Modulation  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$  ... Quotienten  $A_2/B_2$ ,  $B_2/A_2$ ,  $A_2/C_2$ ,  $C_2/A_2$ ,  $B_2/C_2$ ,  $C_2/B_2$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; und anschließend die für den zu untersuchenden Organismus erhaltenen Werte durch die entsprechenden für die Normgruppe(n) erhaltenen Werte dividiert werden, wodurch sich normierte Effektorquotienten ergeben, die in ihrer Gesamtheit ein normiertes Effektorquotientenprofil für den zu untersuchenden Organismus bilden,

und

(d) eine Risikokonstellation, ein Krankheitszustand oder eine Prädispositionen dafür durch den Vergleich der normierten Modulations- und Effektorquotientenprofile des zu untersuchenden Organismus mit denen einer entsprechenden Untersuchungsgruppe, bei der die interessierende Risikokonstellation, der interessierende Krankheitszustand oder die interessierende Prädisposition vorliegt, diagnostiziert bzw. gesichert oder ausgeschlossen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei in Schritt (b) die Lipidmessparameter unter Messparametern für ungesättigte Fettsäuren, Abbau- und Syntheseeenzyme für ungesättigte Fettsäuren, sowie dafür kodierende Nukleinsäuren, und



unter solchen für Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren, sowie dafür kodierende Nukleinsäuren, ausgewählt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die ungesättigten Fettsäuren unter dem Thrombozyten-aktivierenden Faktor und den Eicosanoiden ausgewählt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Eicosanoide unter den Peptid-Leukotrienen, Prostaglandin E2, Thromboxan A2 und Thromboxan B2 ausgewählt werden.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei in dem in Anspruch 1 definierten Schritt (b) als stimulierende Leitsubstanz der Effektor Arachidonsäure oder ein chemotaktisches Peptid verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei in dem in Anspruch 1 definierten Schritt (b) als weiterer modulierender Effektor ein Stoff verwendet wird, der einen Krankheitszustand hervorrufen kann oder an dessen Entstehung oder Entwicklung beteiligt ist.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Krankheitszustand ausgewählt ist unter Tumoren, cystischer Fibrose, Polyposis, Asthma bronchiale, einer Unverträglichkeit, Gerinnungsstörungen, Infektbewältigung und einer Entzündung.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Krankheitszustand ausgewählt ist unter entzündlichen und neoplastischen Veränderungen des Magen-Darm-Traktes.

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Unverträglichkeit eine Nahrungsmittel-, Nahrungsmittelzusatzstoff- oder Arzneimittelunverträglichkeit oder eine Allergie ist, und wobei die Gerinnungsstörungen die Basis für Thrombosen oder Blutungen oder Thrombophilie darstellen, und wobei die Infektbewältigung eine Abwehr bakterieller, viraler oder mykotischer Elemente, z.B. bei bakterieller, viraler oder mykotischer Mucositis, ist, und wobei die Entzündung Enzephalitis, Sinusitis, Rhinitis, Neurodermitis, Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Arzneimittelunverträglichkeit eine Analgetikaunverträglichkeit und die Allergie eine Pollen-, Sporen-, Milben-, Wespen- oder Bienengiftallergie ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Analgetikaunverträglichkeit Acetylsalicylsäureunverträglichkeit ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, wobei zur Bestimmung der Lipidmessparameter ein oder mehrere, gegebenenfalls markierte(s) Eicosanoid(e) oder der Farbstoff 9-Diethylamino-5H-[alpha]phenoxazin-5-on verwendet wird/werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, wobei zur Bestimmung der Lipidmessparameter immobilisierte Sonden verwendet werden, die ausgewählt sind unter Antikörpern oder funktionellen Fragmenten davon gegen Abbau- oder Syntheseeenzyme von ungesättigten Fettsäuren oder gegen Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren; Nukleinsäuren, die an Nukleinsäuren hybridisieren, die für Abbau- oder Syntheseeenzyme von ungesättigten Fettsäuren oder für Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren kodieren.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Antikörper unter polyklonalen, monoklonalen und Single-chain-Antikörpern, und die Nukleinsäuren unter cDNA, mRNA und Oligonukleotiden ausgewählt werden.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei die immobilisierten Sonden ein adressierbares Muster auf einer Oberfläche bilden.

16. Verfahren zur Überwachung des Verlaufs von Therapien von Krankheitszuständen auf der Grundlage von Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 nach der Verabreichung oder in Gegenwart eines geeigneten Medikaments durchgeführt wird.

17. Verfahren zum Auffinden von Wirkstoffen zur Behandlung von Krankheitszuständen auf der Grundlage von Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 nach der Verabreichung oder in Gegenwart eines Kandidatenwirkstoffs durchgeführt wird.

18. Verfahren zum Auffinden von Stoffen, die in der Lage sind, einen Krankheitszustand gemäß einem der Ansprüche 7 bis 11 auszulösen, auf der Grundlage von Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 nach der Verabreichung/Applikation oder in Gegenwart eines solchen Stoffes durchgeführt wird.

Schäfer/Baenkler  
Case 139WO

46

19. Messinstrument zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 18, das eine Oberfläche aufweist, auf der in Anspruch 13 oder 14 definierte Sonden immobilisiert sind.

5

20. Messinstrument nach Anspruch 19, wobei die Sonden ein adressierbares Muster auf der Oberfläche bilden.

Schäfer/Baenkler  
Case 139WO

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose bzw. zur  
5 Sicherung oder zum Ausschluss von Risikokonstellationen,  
Krankheitszuständen oder Prädispositionen dafür, sowie ein  
Verfahren zur Überwachung des Verlaufs von Therapien und zum  
Auffinden von Wirkstoffen zur Behandlung von  
Krankheitszuständen und zum Auffinden von Stoffen, die einen  
10 solchen Krankheitszustand auslösen können, auf der Grundlage  
von Lipidmessparameter-Modulations/Effektorquotientenprofi-  
len. Ferner betrifft die Erfindung ein Messinstrument zur  
Durchführung der obigen Verfahren.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**